

اثر هیپرترمی قبل از تابش نوترون در ایجاد آسیبهای کروموزومی در لنفوسیت انسان

داریوش فاتحی *

چکیده:

با توجه به اهمیت انتخاب روشهای مناسب درمانی در درمانهای مرکب جهت از بین بردن انواع سرطانها در این تحقیق اثر هیپرترمی قبل از تابش دوز پائین نوترون در لنفوسیت انسان بررسی شد. نمونههای خون به طور جداگانه تحت تأثیر هیپرترمی (دمای $41/5^{\circ}\text{C}$ به مدت ۳۰ و ۶۰ دقیقه و دمای 43°C به مدت ۱۵ و ۳۰ دقیقه)، تابش 10cGy نوترون، و همچنین هیپرترمی و سپس تابش قرار گرفتند. پس از انجام مراحل کشت و رنگ آمیزی، آسیبهای کروموزومی شمارش شده و بر روی آنها بررسیهای آماری انجام شد. نتایج نشان داد که هیپرترمی در $41/5^{\circ}\text{C}$ آسیب کروموزومی ایجاد نمی کند اما در 43°C این آسیبها دیده شد ($P < 0.05$). در گروههای تابش شده با 10cGy نوترون مجموع آسیبها از سایر گروهها بیشتر است و با گروههای شاهد و هیپرترمی تنها اختلاف معنی دار نشان می دهد ($P < 0.05$) اما با گروههایی که یکساعت قبل از تابش تحت هیپرترمی قرار گرفتند اختلاف معنی دار نشان نمی دهد و این نتیجه برای هر دو درجه حرارت $41/5^{\circ}\text{C}$ و 43°C مشابه می باشد. به نظر می رسد هیپرترمی قبل از تابش نوترون در تعداد آسیبهای کروموزومی لنفوسیتها تغییر چندانی ایجاد نمی کند که می تواند در انتخاب روش درمان مورد توجه قرار گیرد.

واژه های کلیدی: نوترون، هیپرترمی، آسیب کروموزومی

مقدمه:

استفاده از این پرتو در درمان تومورها شود. از طرف دیگر حساسیت بیشتر سلولهای هیپوکسیک نسبت به هیپرترمی (افزایش درجه حرارت) باعث شده که استفاده توأم از این دو روش درمانی مورد توجه رادیوتراپیستها واقع شود. با توجه به اینکه در تحقیق قبلی اثر هیپرترمی بعد از تابش نوترون مورد بررسی قرار گرفت و نشان داده شد که هیپرترمی اثر اشعه نوترونی را افزایش می دهد (۱)، در این تحقیق اثر هیپرترمی قبل از تابش نوترون مورد بررسی قرار گرفت و سؤال اساسی در تحقیق حاضر این است که آیا اعمال هیپرترمی قبل از تابش نوترون باعث افزایش آسیبهای کروموزومی خواهد

یکی از مشکلاتی که در رادیوتراپی با اشعه X و گاما مشاهده می شود مقاومت سلولهای هیپوکسیک مرکزی تومورهاست که به این پرتوها نسبتاً مقاومند و اگر تعداد کمی از آنها زنده بمانند مجدداً تومور رشد می کند. به همین علت تلاشهایی برای حل این مشکل انجام شده از جمله روش درمانی مرکب از هیپرترمی و تابشهای نوترونی. قدرت نفوذ زیاد نوترون و رسیدن آن به قسمتهای مرکزی تومورها، عدم ترمیم آسیبهای قابل کشنده (Potentially lethal damages (PLD) و ترمیم ناچیز آسیبهای زیرکشنده (Sub lethal damages (SLD) ناشی از نوترون باعث شده امروزه توجه زیادی به

*عضو هیأت علمی گروه فیزیک - دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد

شد یا خیر؟ یعنی آیا هیپرترمی باعث حساستر شدن سلولها می‌شود یا خیر؟ لذا هدف از این تحقیق بررسی اثر هیپرترمی بر لنفوسیت‌هایی است که یک ساعت بعد تحت تابش نوترون 10 cGy قرار خواهند گرفت.

مواد و روشها:

در این مطالعه نمونه‌ها از افراد سالم مذکر $25-30$ ساله و غیر سیگاری که قبلاً رادیوتراپی نشده‌اند تهیه شد. پس از تهیه خون هپارینه (5000 واحد در میلی‌لیتر) 3 ml از آن درون شیشه‌های استریل ریخته شد. یک نمونه بدون اعمال هیپرترمی و تابش بعنوان شاهد اول انتخاب شد. چهار عدد از نمونه‌ها درون انکوباتور $37/5^\circ\text{C}$ به مدت 30 و 60 دقیقه قرار گرفتند. سپس با فاصله یک ساعت دو عدد از این نمونه‌ها همراه با یک نمونه بدون هیپرترمی تحت تابش 10 cGy نوترون قرار داده شدند. یک نمونه هم از ابتدا تا انتهای آزمایش درون انکوباتور 37°C نگه داشته شد (بعنوان شاهد دوم جهت بررسی اثر عوامل مختلف محیطی در حین نقل و انتقال و تابش). برای درجه حرارت 37°C به مدت 15 و 30 دقیقه هم آزمایشات به همین صورت انجام شد. دلیل انتخاب دمای $37/5^\circ\text{C}$ این است که حد تحمل سلولهای بدن انسان در این درجه حرارت می‌باشد و علت انتخاب دمای 43°C این است که حداکثر اختلاف حساسیت گرمایی بین سلولهای سالم و سرطانی در این درجه حرارت مشاهده شده است (۱۲). برای اعمال این درجه حرارتها از انکوباتور ساخت شرکت شیمی فن استفاده شد و درجه حرارتها هر پنج دقیقه توسط یک دماسنج کالیبره (با دقت $1/10^\circ\text{C}$) کنترل شد. منبع نوترون مورد استفاده، کالیفرنیوم ^{252}Cf (ساخت شرکت Amersham) موجود در آزمایشگاه دوزیمتری نوترون سازمان انرژی اتمی ایران بود. نیمه عمر این چشمه $2/65$ سال، شعاع تابش $3/5\text{ cm}$ ، تندی دوز $1/52\text{ cGy/hr}$ و انرژی آن بین $1-6\text{ Mev}$ می‌باشد.

برای تهیه کشت کروموزومی 5 ml از هر نمونه را درون 4 ml محیط کشت RPMI-1640 (شرکت بهار افشان) ریخته و به آن 1 ml سرم جنینی گوساله (Gibco)، 100 واحد/ml پنی سیلین، 100 µg/ml استرپتومایسین و 2 ml عامل میتوزن Phytohaemagglutinin (PHA) (شرکت بهار افشان) افزوده شد. سپس نمونه‌ها به مدت 48 ساعت درون انکوباتور 37°C نگهداری شدند. پس از این مدت به هر کدام از محیط‌های کشت 1 ml کولشی سین (2 mg/ml) (بهار افشان) اضافه شد و مجدداً محیطها برای مدت 3 ساعت دیگر درون انکوباتور قرار گرفتند. سپس با استفاده از KCl با غلظت 0.075 mol/L به سلولها شوک هیپوتونیک وارد کرده و با استفاده از محلول فیکساتیو تازه (شامل سه حجم الکل متانول و یک حجم اسید استیک خالص) سلولها شستشو داده شدند. بعد از این مراحل چند قطره از محلول بر روی لام ریخته شد و لامهای تهیه شده توسط رنگ گیمسای 5% رنگ آمیزی شدند (۸،۴). برای بررسی کروموزومها از میکروسکوپ نوری ZIESS آلمان استفاده شد.

تعداد متافاز در نمونه‌های شاهد و تابش نوترون هر کدام 400 مورد، در گروههای هیپرترمی هر کدام 300 مورد و در گروههای هیپرترمی و تابش هر کدام 200 مورد، بررسی شد و برای تجزیه و تحلیل آماری نتایج از آزمونهای آنالیز واریانس یکطرفه و Student t-test استفاده شد. در همه گروههای مورد آزمایش دو سری نمونه کنترل بعنوان شاهد اول و دوم انتخاب شد، شاهد اول معرف نمونه‌هایی است که بلافاصله بعد از تهیه بدون هیچ تیماری کشت داده شدند و شاهد دوم هم معرف نمونه‌هایی است که از ابتدا تا انتهای آزمایش درون انکوباتور 37°C گذاشته شدند و در پایان مراحل هیپرترمی و تابش بر روی نمونه‌های دیگر، همزمان با آنها از این نمونه (شاهد دوم) هم کشت تهیه شد تا بتوان اثر عوامل محیطی، طول مدت زمان و تغییرات درجه

جدول شماره ۱: میانگین فراوانی آسیبهای کروموزومی پس از اعمال هیپرترمی

تیمار	X+SE
شاهد اول	۱/۷۵+۰/۴۷
شاهد دوم	۲+۰/۴
۴۱/۵°C-۳۰min	۲/۶۶+۰/۶
۴۱/۵°C-۶۰min	۴/۶۶+۰/۶
۴۳°C-۱۵min	۹+۱*
۴۳°C-۳۰min	۱۱+۱/۵۲*

X+SE نشان دهنده میانگین + خطای استاندارد می باشد.
*: میانگین کل آسیبها در این دو گروه با سایر گروهها اختلاف معنی دار نشان می دهد ($P < 0.05$).

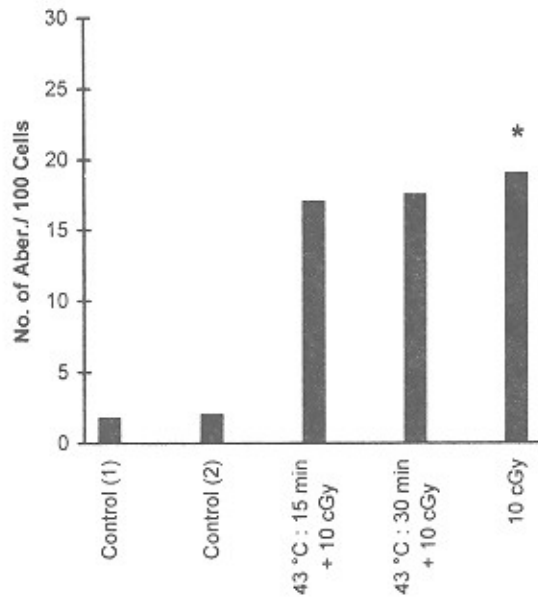
گروهها بیشتر می باشد و در سطح $P < 0.01$ با گروههای شاهد اختلاف معنی دار نشان می دهد (نمودار شماره ۱). از مقایسه نتایج بین گروههایی که قبل از تابش ۱۰cGy نوترون به مدت ۳۰ و ۶۰ دقیقه تحت تأثیر هیپرترمی در دمای ۴۱/۵°C واقع شدند با سایر گروهها مشاهده می شود میانگین آسیبهای از نوع حذف و تبادل و شکافهای کروموزومی و کروماتیدی در گروه شاهد اول حداقل می باشد و در گروه تابش تنها از سایر گروهها بیشتر است ($P < 0.01$). در مجموع فراوانی کل آسیبها در گروه تابش نوترون تنها از سایر گروهها بیشتر می باشد و با گروههای شاهد اختلاف معنی دار نشان می دهد ($P < 0.05$) اما بین گروههایی که ابتدا هیپرترمی شده و سپس نوترون دریافت کرده اند با گروه تابش تنها فراوانی شکافها، حذف و تبادلات کروموزومی و همچنین نوع کروماتیدی اختلاف معنی دار نشان نمی دهد. در این مقایسه، بین فراوانی کل آسیبها در گروه تابش شده با ۱۰cGy نوترون با گروههایی که یک ساعت قبل از تابش نوترون تحت تأثیر هیپرترمی ۴۱/۵°C (در زمان ۳۰ و ۶۰ دقیقه) واقع شدند اختلاف معنی دار مشاهده نشد.

حرارت در حین نقل و انتقال نمونه ها را بررسی نمود.

نتایج:

پس از بررسی کروموزومهای متافازی این نتایج حاصل شد: در هر دو گروه شاهد اول و دوم شکاف کروموزومی دیده نشد و میانگین حذف و تبادل کروموزومی بسیار کم بود. میانگین شکافها و حذف و تبادلات کروماتیدی هم در هر دو گروه بسیار کم بود و در مجموع فراوانی کل آسیبهای کروموزومی بین گروههای شاهد اول و دوم اختلاف معنی داری نشان نمی دهد (جدول شماره ۱). در گروههای هیپرترمی در دمای ۴۱/۵°C برای زمانهای ۳۰ و ۶۰ دقیقه میانگین کل آسیبهای کروموزومی با گروههای شاهد اختلاف معنی داری نشان نداد اما در گروههای ۴۳°C به مدت ۱۵ دقیقه میانگین آسیبهای از نوع شکاف کروموزومی از سایر گروهها بیشتر است. همچنین میانگین حذف و تبادل کروموزومی در گروهی که ۳۰ دقیقه تحت هیپرترمی ۴۳°C واقع شدند از سایر گروهها بیشتر است و با گروههای شاهد اختلاف معنی دار نشان می دهد ($P < 0.05$) ولی در مقایسه با گروههای هیپرترمی ۴۱/۵°C تفاوت معنی داری مشاهده نمی شود در مجموع در گروههای هیپرترمی ۴۳°C فراوانی کل آسیبها از سایر گروهها بیشتر است و بخصوص در گروه ۴۳°C و زمان ۳۰ دقیقه با گروههای شاهد اختلاف معنی داری نشان می دهد ($P < 0.05$) (جدول شماره ۱).

در گروههای تابش نوترون فراوانی شکافهای کروموزومی نسبت به گروههای شاهد بیشتر می باشد. همچنین میانگین حذف و تبادل کروموزومی در گروه شاهد اول از همه کمتر و در گروه تابش تنها در حداکثر می باشد. آسیبهای از نوع کروماتیدی نیز در گروه تابش نوترون از سایر گروهها بیشتر است و در مجموع میانگین کل آسیبهای کروموزومی برای شاهد اول از سایر گروهها کمتر و در گروههای تابش تنها از سایر



نمودار شماره ۲: فراوانی تعداد کل آسیبهای کروموزومی

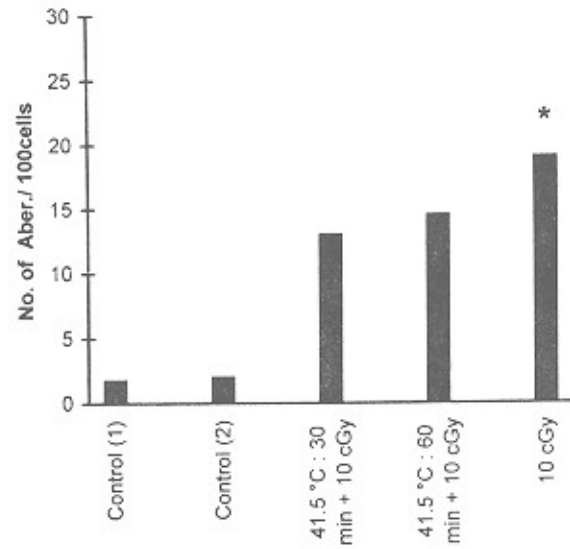
در دمای 43°C و تابش 10 cGy نوترون

*فراوانی کل آسیبها در این گروه با گروههای شاهد اختلاف معنی دار نشان می دهد ($P < 0.05$) ولی با گروههای هیپرترمی و تابش اختلاف معنی داری نشان نمی دهد.

بحث:

طبق نتایج بدست آمده در این مطالعه در بررسی اثر درجه حرارت تنها بر آسیبهای کروموزومی با توجه به جدول شماره ۱ مشاهده می شود که در هیپرترمی در دمای 41.5°C تعداد آسیبها با گروههای شاهد اختلاف معنی داری ندارد و می توان گفت در این درجه حرارت، هیپرترمی باعث ایجاد آسیبهای کروموزومی نمی شود. این نتیجه با نتایج Weisenbron و obe (۱۹۹۰) مشابه است. ایشان نتیجه گرفتند که هیپرترمی در هیچکدام از فازهای سیکل سلولی آسیب ایجاد نمی کند (۱۴). Mitchel و همکارانش (۱۹۸۵) با مطالعه لنفوسیتها در دمای 42°C تا 46°C آسیبهای کروموزومی را مشاهده کردند (۱۰) اما Weisenborn و obe نتیجه گرفتند حتی با 45°C هیپرترمی به مدت ۱۵ دقیقه آسیب ایجاد نمی شود (۱۴).

در بررسی تابش دوز کم نوترون (10 cGy) همانطوری که مشاهده شد این دوز نوترون در لنفوسیتهای خون انسان باعث ایجاد آسیبهای کروموزومی می شود و فراوانی



نمودار شماره ۱: فراوانی تعداد کل آسیبهای کروموزومی در

دمای 41.5°C و تابش 10 cGy نوترون

*فراوانی کل آسیبها در این گروه با گروههای شاهد اختلاف معنی دار نشان می دهد ($P < 0.05$) ولی با گروههای هیپرترمی و تابش اختلاف معنی داری نشان نمی دهد.

(نمودار شماره ۱).

در بررسی اثر درجه حرارت 43°C در گروههایی که یک ساعت قبل از تابش 10 cGy نوترون به مدت ۱۵ و ۳۰ دقیقه تحت هیپرترمی 43°C واقع شدند مشاهده می شود میانگین آسیبهای از نوع حذف و تبادیل کروموزومی در گروه شاهد اول کمتر از سایر گروهها و در گروه فقط تابش دیده بیشتر از سایر گروههاست. بررسیهای آماری نیز بین این دو گروه اختلاف معنی دار نشان می دهد ($P < 0.05$). این نتیجه برای آسیبهای از نوع حذف و تبادیل کروماتیدی نیز مشابه می باشد. در مجموع فراوانی کل آسیبها در گروه تابش تنها از سایر گروهها بیشتر و در گروه شاهد اول از سایر گروهها کمتر می باشد و فراوانی تعداد آسیبها بین این دو گروه اختلاف معنی دار نشان می دهد ($P < 0.05$) از طرف دیگر مقایسه بین فراوانی کل آسیبها در گروههایی که قبل از تابش 10 cGy نوترون، هیپرترمی 43°C شده بودند با گروههای شاهد و هیپرترمی تنها اختلاف نشان می دهد اما با گروه تابش تنها اختلاف معنی داری نشان داده نشد (نمودار شماره ۲).

آسیبها با گروههای شاهد اختلاف معنی دار نشان می دهد ($P < 0.05$) که این نتیجه با نتایج تحقیقات Bateman و Bond مطابقت دارد (۲).

در بررسی نتایج نمونه هایی که یک ساعت پس از اعمال هیپرترمی تحت تابش 10cGy نوترون واقع شدند با توجه به نمودارهای شماره ۲ و ۱ مشاهده می شود تعداد کل آسیبها تفاوت معنی داری با تعداد کل آسیبها در گروههایی که فقط تحت تابش 10cGy نوترون بوده اند نشان نمی دهد. Nielsen (۱۹۸۳) هم با اعمال درجه حرارت 42°C به مدت ۹۰ دقیقه بر روی سلولهای L1A2 نشان داد در شرایط *in vitor* هیپرترمی قبل از تابش اشعه ایکس باعث ایجاد مقاومت در این سلولها می شود (۱۱) و این با نتیجه تحقیق حاضر مطابقت دارد. Cai و Jiang (۱۹۹۵) هم با مطالعه لنفوسیتها نشان دادند هیپرترمی قبل از تابش باعث ایجاد یک مقاومت نسبی در این سلولها می شود و تعداد آسیبهای کروموزومی کمتر از موقمی است که هیپرترمی پس از تابش اشعه اعمال می شود (۳).

در یکسری از مطالعات نتایج بدست آمده با نتایج تحقیق حاضر متضاد می باشند از جمله Jorritsma (۱۹۸۳) با مطالعه بر روی سلولهای Hela نشان داد هیپرترمی $43-45^{\circ}\text{C}$ قبل از تابش اشعه باعث افزایش آسیبها می شود (۹). Hume و همکارانش (۱۹۸۲) نشان دادند در یافت روده موش و غضروف Rat هیپرترمی قبل از تابش اشعه باعث تشدید آسیبها می شود و این نتیجه برای اشعه X و نوترون یکسان می باشد (۷). در یکسری از مطالعات اثر هیپرترمی قبل و بعد از تابش اشعه یکسان بوده است از جمله در مطالعه Obe و Weissenborn (۱۹۹۰) نشان داده شد هیپرترمی قبل یا بعد از تابش در هر دو صورت باعث افزایش تعداد آسیبهای کروموزومی می شود (۱۴). این تفاوت در نتایج بدست آمده از تحقیقات مختلف ناشی از اختلاف شرایط متفاوت درجه حرارت، طول مدت زمان اعمال هیپرترمی

و فواصل مختلف زمانی بین هیپرترمی و تابش می باشد. به طور کلی تابش پرتوهای نوترونی باعث ایجاد آسیبهای کروموزومی در سلولها شده و بدنبال آن مرگ سلولی افزایش می یابد، از طرف دیگر از نتایج تحقیقات گسترده ای که در استفاده توأم هیپرترمی و نوترون بدست آمده مشاهده می شود در مواردی که هیپرترمی بعد از تابش نوترون اعمال شده، تعداد آسیبهای کروموزومی و در نتیجه مرگ سلولی افزایش می یابد. اما در یکسری از تحقیقات و از جمله در تحقیق حاضر، هیپرترمی قبل از تابش نوترون تغییری در تعداد آسیبهای کروموزومی ایجاد نمی کند که بنظر می رسد این در اثر مقاومتی است که افزایش درجه حرارت در سلولها ایجاد کرده است. در واقع حرارت سبب سنتز دسته خاصی از پروتئینها موسوم به Heat Shock Protein (HSP) می شود که این پروتئینها در اثر شوک حرارتی در دماهای بالا (43°C و بالاتر) سبب مهار سنتز پروتئینهای دیگر شده و در نتیجه در غشاء سلولی تغییراتی بوجود آمده و باعث ایجاد مقاومت گرمائی در سلولها می شود و لذا تعداد آسیبها و مرگ سلولی افزایش پیدا نمی کند (۵، ۶، ۱۳).

نتایج و مشاهدات این تحقیق نشان میدهد که اعمال هیپرترمی قبل از تابش نوترون نمی تواند بعنوان یک روش مناسب جهت بهتر شدن نتیجه درمانهای مرکب انتخاب شود.

منابع:

- ۱- فانچی داریوش. اثر هیپرترمی بر ناهنجاریهای کروموزومی ناشی از تابش نوترون در لنفوسیت‌های خون محیطی انسان. مجله دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد، ۱ (۱): ۵۴-۶۰، ۱۳۷۸.
- 2- Bateman JL.; Bond VP. Lens opacification in mice expose to fast neutrons. Radiat Res (suppl), 239-46, 1967.
- 3- Cai Lu.; Jie J. Mild hyperthermia can induce adaptation to cytogenetic damage caused by subsequent X-irradiation. Radiat Res, 143: 26-33, 1995.
- 4- Evans HJ.; Maureen LO. Human peripheral blood lymphocytes for the analysis of chromosome aberration in mutagen tests. Mut Res, 31: 35-48, 1975.
- 5- Hall EJ.; Towel LR. Biological effects of heat. Cancer Res (supp), 44: 4708-13, 1984.
- 6- Henle KJ.; Dethlefsen LA. Heat fractionation and thermotolerance. Cancer Res, 38: 1843-51, 1978.
- 7- Hume SP.; Myers R.; Field SB. A comparison of thermal enhancement ratio for fast neutron and X-irradiation of two normal tissue in rodents. Br J Radiol, 55(650): 151-55, 1982.
- 8- Int. Atomic Energy Agency: Biological dosimetry, chromosomal aberration analysis for dose assessment , Technical reports series 260, Vienna: 28-37, 1986.
- 9- Jorritsma JB.; Koning AW. The occurrence of DNA strand breaks after hyperthermic treatment of mammalian cells with and without radiation. Radiat Res, 98(1): 198-208, 1984.
- 10- Mitchel RE.; Birnboim HC. Triggering of DNA strand breaks by 45°C hyperthermia and its influence on the repair of gamma radiation damages in human white blood cells. Cancer Res, 45(5): 2040-5, 1985.
- 11- Nielsen OS. Influence of thermotolerance on the interaction between hyperthermia and radiation in L1A2 cells in vitro. Int J Radiat Biol Relat Stud Phys Chem Med, 43(6): 665-73, 1983.
- 12- Raaphorst GP. Fundamental aspects of hyperthermic biology in: an introduction to practical aspects of clinical hyperthermic: From Tylor & Francis. London: UK, 90-8, 1990.
- 13- Rice G.; Lsio A.; Dewey WC. Heat shock protein within the mammalian cell cycle: relation to thermal sensitivity, thermal tolerance and cell cycle progression. J Cell Physiol, 126: 291-97, 1985.
- 14- Weissenborn U.; Obe G. Modification of X-ray induced chromosome aberration frequency by pre- and postirradiation hyperthermia of human peripheral lymphocytes. Int J Radiat Biol, 59(4): 973-84, 1991.